

UNIVERSITÉ PARIS VII
FACULTÉ DE MÉDECINE LARIBOISIÈRE - SAINT-LOUIS

Année 1975

271 N°

THÈSE

pour le

DOCTORAT EN MÉDECINE
(Diplôme d'État)

par

FERRIER-FONTRouGE Madeleine

Née le 27 Mai 1947, à Paris 16°.

Présentée et soutenue publiquement le

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE
DE LA PHAGOCYTOSE CHEZ L'HOMME.

Activité phagocytaire des cellules sanguines
et des cellules obtenues par culture de moelle
à l'état normal et pathologique.

Président : Mr. J. BOUSSER, Professeur.

DUPUYTREN - COPY
9, Rue Dupuytren
PARIS (6°)

1975

UNIVERSITÉ PARIS VII
FACULTÉ DE MÉDECINE LARIBOISIÈRE - SAINT-LOUIS

Année 1975

N°

THÈSE

pour le

DOCTORAT EN MÉDECINE
(Diplôme d'État)

par

FERRIER-FONTRouGE Madeleine

Née le 27 Mai 1947, à Paris 16°.

Présentée et soutenue publiquement le

**CONTRIBUTION A L'ÉTUDE
DE LA PHAGOCYTOSE CHEZ L'HOMME.**

Activité phagocytaire des cellules sanguines
et des cellules obtenues par culture de moelle
à l'état normal et pathologique.

Président : Mr. J. BOUSSER, Professeur.

DUPUYTREN - COPY

9, Rue Dupuytren
PARIS (6°)

1975



FACULTE DE MEDECINE PARIS - LARIBOISIERE - SAINT-LOUIS

COURS PROFESSORAL

Année 1974-1975

DOYENS HONORAIRES :

Professeur J. BERNARD, Professeur J.J. BERNIER

PROFESSEURS HONORAIRES :

M. AUBRY, C. LAUNAY, R. WORMS

DOYEN : Professeur Et. FOURNIER

PROFESSEURS

Dermatologie

G. DEGOS	Prof. de Clinique des maladies cutanées et syphilitiques
F. DUPERRAT	Prof. de Dermatologie
J. CIVATTE	Prof. Agrégé
A. PUISSANT	Prof. Agrégé
S. BELAICH	Prof. Agrégé

Rhumatologie

S. DE SEZE	Prof. de Clinique rhumatologique
A. RYCKEWAERT	Prof. Agrégé
M. KAHN	Prof. Agrégé
A. DRYLL	Prof. Agrégé

Gastro-Entérologie

J.J. BERNIER	Prof. de Clinique gastro-entérologique
J.P. FERRIER	Prof. Agrégé
J.C. RAMBAUD	Prof. Agrégé

Endocrinologie

J. CANIVET	Professeur
G. CATHELIN	Prof. Agrégé

Médecine

D. KUNTZ	Prof. Agrégé
J. ROUFFY	Prof. Agrégé

Chirurgie

J. PERROTIN	Prof. de Pathologie chirurgicale
P. HAUTEFEUILLE	Prof. Agrégé

Orthopédie, Traumatologie;
Chirurgie plastique

P. BANZET	Prof. Agrégé
J. WITWOET	Prof. Agrégé

Neuro-Chirurgie

R. HOUDART	Professeur
J. COPHICNON	Prof. Agrégé

Hématologie

J. BERNARD	Prof. de Clinique des maladies du sang
J. DAUSSET	Prof. d'Immunologie-Hématologie
M. BOIRON	Professeur
M. SELIGMANN	Professeur
Y. NAJEAN	Prof. sans chaire
J. CAEN	Prof. Agrégé
J. COLOMBANI	Prof. Agrégé
C. JACQUILLAT	Prof. Agrégé
G. SCHAISON	Prof. Agrégé

Cardiologie

Y. BOUVRAIN	Prof. de Clinique cardiologique
J.J. WELTI	Prof. sans chaire
R. SLAMA	Prof. Agrégé
R. GOURGON	Prof. Agrégé
G. MOTTE	Prof. Agrégé

Thérapeutique

M. LAMOTTE	Prof. de Clinique thérapeutique
J M. SEGRESTAA	Prof. Agrégé

Toxicologie

M. GAULTIER	Prof. de Clinique toxicologique
P. GERVAIS	Prof. Agrégé

Médecine légale

E. FOURNIER Prof. de Médecine légale et Toxicol.
M.L. EFTHYMIU Prof. Agrégé

Pathologie expérimentale

F.P. MERKLEN Prof. de Pathologie expérimentale
F. COTTENOT Prof. sans chaire

Parasitologie

M. LARIVIERE Professeur

Neurologie

D. PEPIN Prof. sans chaire

Psychiatrie adulte

A. GORCEIX Prof. Agrégé

Psychiatrie infantile

M. DUGAS Prof. Agrégé

Pédiatrie

H. LESTRADET	Prof. sans chaire
B. LABRUNE	Prof. Agrégé

Gynécologie - Obstétrique

P. MORIN	Professeur
P. ENGELMANN	Prof. Agrégé

Urologie

C. CHATELAIN Prof. Agrégé

Oto-Rhino-Laryngologie

P. PIALOUX	Prof. de Clinique d'Oto-Rhino- Laryngologie
G. FREYSS	Prof. Agrégé

Pneumo-Phthisiologie

L. ISRAEL Prof. Agrégé

Ophthalmologie

M. FONTAINE Prof. Agrégé

Histologie

J. LAVEDAN Prof. sans chaire

M. MAILLET Prof. Agrégé

C. BOUTON Chargé de Cours

Anatomie pathologique

J. ROUJEAU Professeur

N. CHELLOUL Prof. Agrégé

Bactériologie

Y. PEROL Prof. Agrégé

Anesthésiologie

J.F. MONTAGNE Prof. Agrégé

E. ECHTER Prof. Agrégé

Radiologie

M. LAVAL-JEANTET Prof. Agrégé

M.C. PLAINFOSSE Prof. Agrégé

R. DJINDJIAN Prof. Associé

Pharmacologie

P. LECHAT Professeur

Biophysique

A. DJOURNO Prof. de Physique médicale

M. BURGEAT Prof. Agrégé

M. DUVELLEROY Prof. Agrégé

Physiologie

A. TEILLAC Prof. sans chaire

J.P. MARTINEAUD Prof. sans chaire

H. MAMO Prof. Agrégé

Biochimie

M. BOURRILLON	Professeur
P. TIOLLAIS	Prof. Agrégé
Y. GOUSSAULT	Chargé de cours

Anatomie

J.P. LASSAU	Prof. Agrégé.
-------------	---------------

Psychologie

L. MOOR	Chargé de cours
---------	-----------------

MEDECINS, CHIRURGIENS et SPECIALISTES DES HOPITAUX

MM. BARCAT Jean - BENNET Jean - CALVET Jean -
CHARLEUX Henri - COUINAUD Claude - DESPREZ-CURELY
Jean-Paul - DUBOST Claude - HERRAULT André -
LAVAYLE Jean-André - LANCE Marcel - LAROCHE Jean-
François - MARIE René - MAY Jean-Pierre - PESTEL
Maurice - RICHARD Claude - SARRAUX Henri - VIGNAUD
DUPUY de SAINT-FLORENT Georges

DIRECTEURS D'ENSEIGNEMENT CLINIQUE

MM. ACCARD Jean-Loup - ALBERTINI Frédéric - BARDIAUX
Maurice - BENAD - BERTRAND Y. - BITOUN Georges -
CALLEROT Louis - Mme CHAIGNEAU Hélène - CHALANSET
René - CHAQUAT Yves - DELANOE Yves - DELTEIL Pierre -
DESFOSSÉS Louis - DURAND Claude - ELBAZ Pierre -
ELIACHAR Edouard - FERREZ Bernard - GANEM Jean -
Mme GIACOMINI Thérèse - M.M. GOUDAL GRUPPER Charles-
HUGUET Jean-Claude - KALMANSON Daniel - LEFEVRE
Lucien - DOGEAY R. - LIBESKING Marcel - MARTIN-
DUPRAY Daniel - MARTINETTI J. - Mme MAY Véré -
M.M. MAZZA R. - MICHOL François - NEHLIL Jacques -
PARIENTE Philippe - PARIENTE Maurice - PASQUIER P.-
PIRET Jean-Marie - PLANE Jean-Louis - POUJOL Jean -
RACIENE Yves - RENE Louis - Mme RENIE Odila -
M.M. RONCHON Claude - SCHWEICH Michel - SIGAL Simon -
SUCHESTOW VERGNON M. - VIGUIE Roger - Mme XIMENES
Geneviève.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Je remercie

Monsieur le Professeur J. BOUSSER

Chef du Service d'Hématologie
de l'Hôtel-Dieu

qui a permis la réalisation
de ce travail en m'accueil-
lant dans son Service et
qui m'a fait l'honneur
d'accepter la présidence
de cette thèse.

A

Madame le Docteur M. CADIOU

Chef de travaux

Au personnel du Laboratoire de Cytochimie

qui ont bien voulu faciliter
mon travail expérimental,

j'exprime mes remerciements.

A mon réconfort de chaque jour : mon mari.

A mes parents, que je ne saurai jamais assez remercier.

A ma famille

A ma belle-famille

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA PHAGOCYTOSE CHEZ L'HOMME

ACTIVITE PHAGOCYTAIRE DES CELLULES SANGUINES
ET DES CELLULES OBTENUES PAR CULTURE DE MOELLE
A L'ETAT NORMAL ET PATHOLOGIQUE

INTRODUCTION

Depuis les travaux de METCHNIKOFF en 1892, on sait que l'organisme est capable de lutter contre une infection en détruisant les éléments étrangers à l'aide de cellules spécialisées : les phagocytes.

Ces cellules sont de deux types : ce sont les polynucléaires surtout neutrophiles et les macrophages. Des travaux récents permettent de situer le problème (STOSSEL, 1974).

La phagocytose comporte quatre phases :

- 1- Le chimiotactisme : Les cellules sont attirées par des cytotoxines, donc se déplacent dans leur direction. Elles sont ainsi appelées en très grand nombre au niveau du site inflammatoire.
- 2- L'opsonisation : Les bactéries sont rendues plus aptes à la phagocytose par la présence de substances contenues dans le sérum frais. Les opsonines ont un rapport direct avec l'activité Antigène - Anticorps de l'organisme et permettent la mise en contact de la bactérie et de la membrane de la cellule phagocytaire.
- 3- L'ingestion : Les phagocytes englobent la particule étrangère. Il se forme une vacuole de phagocytose.
- 4- La digestion : Les enzymes contenues dans les

granulations se déversent dans la vacuole de phagocytose. Les micro-organismes sont détruits au terme d'une succession de réactions enzymatiques.

L'étude de la phagocytose et de ces quatre phases chez l'homme et chez l'animal a jusqu'ici été conduite sur les éléments phagocytaires du sang circulant.

La culture de moelle a été rendue possible à la suite des travaux de PLUZNICK (PLUZNICK - SACHS, 1965) en 1965 et de BRADLEY et METCALF (BRADLEY et METCALF, 1966), à la même époque.

Ces auteurs ont réussi à cultiver la moelle de souris in vitro dans un gel d'agar.

La condition nécessaire au succès de la culture est d'introduire un facteur stimulant (C.S.F. ou Colony Stimulating Factor) qui provient, soit d'une sous-couche de cellules stimulantes (PLUZNICK - SACHS, 1965 et BRADLEY - METCALF, 1966), soit d'un milieu conditionné (BRADLEY - SUMMER, 1968), préparé à l'avance à partir des mêmes cellules (fibroblastes, cellules spléniques, cellules embryonnaires rénales, monocytes...). On observe la disparition rapide des cellules médullaires introduites dans le milieu ; seules, les cellules souches persistent et peuvent être reconnues rétrospectivement par les colonies auxquelles elles donnent naissance. Les cellules souches granuleuses sont appelées CFU-C (Colony Forming Cells in Culture).

Les colonies sont formées de cellules granuleuses d'abord immatures au 4ème-5ème jour. Puis, les colonies atteignent leur maximum de taille vers le 8ème jour, tandis que la cytologie évolue.

Les métamyélocytes et polynucléaires neutrophiles, éosinophiles sont présents (METCALF et BRADLEY, 1967). Des macrophages nés des mêmes cellules souches (METCALF, J.Cell. Physiol., 1971)

font leur apparition et tendent à supplanter les éléments granuleux à partir du 9ème jour.

Chez l'homme, la technique en agar est applicable (SENN, 1967), ainsi que dans d'autres milieux telle la méthyl-cellulose (ICHIKAWA, 1966) (WORTON, 1969), ce dernier milieu ayant l'avantage de permettre un pipettage plus facile des colonies (DAO CYTOCENTRIF, 1974). Chez l'homme, le développement des colonies est plus long, le développement complet se faisant en 14 jours sans que les granuleux disparaissent complètement (CHEVERNICK et BOGGS, 1970 ; DAO, Path. Biol., 1975 ; BLOOD, 1975).

Des résultats préliminaires ont montré que l'étude de la phagocytose pouvait être applicable à la population cellulaire obtenue en culture de moelle chez l'homme (DAO, Bordeaux, 1974) :

- 1- La maturation des granuleux *in vitro* peut être testée par les méthodes classiques très employées pour les cellules phagocytaires du sang.
 - 2- On peut tenter de mettre en évidence des différences entre la phagocytose des sujets normaux et de malades présentant des déficits congénitaux ou acquis de la fonction des polynucléaires. C'est l'ensemble des résultats acquis que nous voudrions présenter. La fonction phagocytaire des éléments granuleux est estimée par plusieurs méthodes : index d'ingestion de levures tuées et de levures vivantes, indice de destruction de levures vivantes (candidacidie). La comparaison a été faite entre la valeur fonctionnelle des polynucléaires du sang circulant et celle des éléments matures cultivés *in vitro*.
-

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I - SELECTION DES PATIENTS

1 - Témoins normaux.

2 - Sujet présentant une possible anomalie congénitale de la phagocytose : il s'agit d'un patient atteint de déficit héréditaire en glucose 6 phosphate déshydrogénase (G6.PD).

3 - Sujets présentant de possibles anomalies acquises de la phagocytose :

a)- Il s'agit de cinq malades avec une leucémie myéloïde chronique (LMC) à une phase variable de l'évolution.

b)- Nous avons ajouté une malade hospitalisée pour une insuffisance thyroïdienne majeure non traitée, puis sous traitement.

II - PREPARATION DES CELLULES PHAGOCYTAIRES

1- Recueil des cellules phagocytaires sanguines : 10 ml de sang sont recueillis par ponction veineuse dans un tube hépariné (tube à ionogramme). La numération des globules blancs et la formule sont faites, afin de déterminer le nombre absolu de polynucléaires présents dans le sang.

Après sédimentation 1 h. à 37°, on prélève le plasma et la couche leucocytaire ("buffy-coat").

On centrifuge la suspension cellulaire et on écarte le surnageant. Le culot cellulaire est lavé deux fois par centrifugation à 800 tours par minute pendant 10 mn en milieu α . Le culot est repris dans 1 ml de milieu α . Une numération et une formule sont faites, qui permettent de diluer la suspension de façon à obtenir une concentration de 5.000 poly-nucléaires par mm^3 .

2- Préparation et recueil des colonies :

a)- Culture :

La technique que nous avons employée utilise un gel de méthyl-cellulose (WORTON, 1969). Les différents temps de la culture sont les suivants (DAO, Path. Biol., 1975) :

- La méthyl-cellulose (Dow Chemical Company) est préparée à la concentration de 2 % dans du milieu nutritif concentré "milieu double" (Eurobio) ;
- Le facteur stimulant est un milieu conditionné obtenu en faisant incubé 20×10^6 leucocytes humains normaux (PIKE et ROBINSON, 1970), dans un gel d'agar à 0,5 % à 37° pendant 7 jours ;
- Le gel contenant les cellules est recouvert d'un liquide comprenant 20 % de sérum de veau foetal (Flobio) dans du milieu α simple (Eurobio).
- La culture elle-même a lieu dans des boîtes de plastique de 35 mm de diamètre (Falcon Company).
- Dans chaque boîte est déposé 1 ml de suspension contenant 2×10^5 cellules médullaires nucléées dans 0,2 ml de milieu α simple, 0,4 ml de méthyl cellulose à 2 %, 0,2 ml de sérum de veau foetal, 0,2 ml de milieu conditionné.
- Les boîtes sont incubées pendant 14 jours dans une étuve à 37° saturée d'humidité et à flux continu de 7,5 % de CO_2 . Le pH reste ainsi constant aux alentours de 7,4.

- La lecture a lieu le 14ème jour : ne sont considérés comme colonies que les groupements cellulaires de plus de 50 cellules.

b)- Prélèvement des colonies :

Les colonies sont prélevées à l'aide de micropipette de 10 µl (Drummond Microcaps) sous contrôle de la vue au microscope optique inversé à l'objectif (x 20).

La moyenne des cellules par colonies est de l'ordre de 200 en méthyl-cellulose. Ce petit nombre n'a pas permis d'étudier la phagocytose pour des colonies séparées ; le prélèvement a donc porté sur un mélange de colonies aspirées par capillarité dans la micropipette.

III - PREPARATION DES LEVURES

1 - Préparation des levures tuées.

Nous avons utilisé indifféremment des levures de boulanger et des *Candida albicans* provenant d'une infection urinaire humaine.

a)- Levures de boulanger (ZITTOUN - BERCHE, 1973).

On fait une suspension de levures : 40 mg de levures dans 50 ml de tampon phosphate à pH 7,4. Ces levures sont tuées par ébullition pendant 30 mn. Elles sont ensuite resuspendues dans le même tampon à la concentration de 50.000/mm³.

b)- *Candida albicans*.

La souche est entretenue par repiquage tous les 7 jours en milieu liquide de l'Institut Pasteur. Les levures sont utilisées pour la phagocytose entre le 3ème et le 10ème jour de la culture. Les levures sont lavées par deux centrifugations successi-

ves à 1.500 tours/mn en tampon phosphate pH 7,4. Elles sont tuées par ébullition et suspendues de la même manière à la concentration de 50.000/mm³.

Dans les deux cas, on vérifie que plus de 95 % des levures sont tuées. La coloration au bleu trypan à 0,5 % montre, en effet, que la quasi-totalité des micro-organismes prennent la coloration bleue.

2 - Préparation des levures vivantes.

Les *Candida albicans* sont lavés deux fois par centrifugation en tampon phosphate pH 7,4. Il faut s'assurer que plus de 90 % des levures restent incolores après 5 mn de contact avec le bleu trypan à 0,5 %. La dilution des levures doit être la même que la suspension cellulaire, pour que le mélange donne une moyenne d'une levure par polynucéaire.

IV - PHAGOCYTOSE

Nous avons étudié deux stades différents de la phagocytose des levures :

- La première méthode fait appel aux levures tuées et explore la capacité d'englobement particulière.

- La seconde utilise les levures vivantes et explore la candidacidie.

1 - Etude de l'englobement de levures tuées.

On met en présence en moyenne 10 levures par cellule phagocytaire avec des proportions optimales de substances opsonisantes : pool de sérum de sujets AB normaux (fourni par la banque de sang de La Pitié).

a)- Etude de l'englobement par les polynucléaires du sang.

Sur le plan pratique, on met en présence, dans un tube de plastique : 0,25 ml de suspension cellulaire à 5.000 polynucléaires par mm³ ; 0,25 ml de suspension de levures tuées à 50.000 par mm³ ; 0,25 ml de sérum ; 0,25 ml de milieu tamponné $\times$. Après incubation de 30 mn à 37°, on arrête la phagocytose en ajoutant 0,08 ml d'E.D.T.A. calcique à 1 % laissé en contact 5 mn à 20° après agitation. Les cellules, ayant phagocyté, sont recueillies par cytocentrifugation (cytocentrifugeuse Shandon Company), puis colorées par le May-Grunwald-Giemsa (M.G.G.). On compte le total des levures ingérées par 200 polynucléaires, puis on établit un index phagocytaire, c'est-à-dire la moyenne des levures par polynucléaire, et un pourcentage de polynucléaires capables de phagocytose.

b)- Etude de l'englobement par les cellules présentes dans les colonies au 14ème jour.

En raison du petit nombre de cellules par colonie, nous avons dû mettre au point des microméthodes dont les résultats sont plus difficiles à quantifier de façon précise.

La première technique est calquée sur la précédente. Elle a lieu dans un tube de plastique, avec des quantités naturellement beaucoup plus faibles. On met en présence : 7.500 cellules dans un volume de 50 mm³ (les cellules sont toujours suspendues dans le milieu de culture que nous avons décrit), 75.000 levures suspendues dans 50 mm³ de tampon, 50 mm³ de sérum normal et 50 mm³ de milieu tamponné $\times$. De la même manière, l'incubation a lieu pendant 30 mn à 37° et la phagocytose est arrêtée en laissant agir pendant 5 mn : 3 mm³ d'E.D.T.A. à 1%. Pour faciliter la cytocentrifugation, on complète le volume à 0,5 ml par du milieu $\times$, et on centrifuge 10 mn à 1.000 tours/minute.

Nous avons expérimenté une microméthode dif-

férente où tous les composants du mélange dans les mêmes proportions sont déposés sur le couvercle d'une boîte de Pétri de plastique.

Le volume total du mélange fait 80 mm³. Les cellules sont récupérées par cytocentrifugation.

Ces deux microméthodes permettent d'apprécier le pourcentage de cellules ayant phagocyté et l'index phagocytaire.

c)- Procédés de cytocentrifugation.

Nous avons essayé deux méthodes, afin de recueillir sur lame le maximum de cellules.

La première, nous l'avons vu, consiste à déposer 0,5 ml de suspension dans le godet de la centrifugeuse ; les cellules se déposent dans un cercle de 7 mm de diamètre.

La seconde méthode consiste à introduire la micropipette de 10 mm³ contenant les cellules dans un support situé dans le godet : les cellules sont projetées dans un cercle de diamètre plus restreint.

Dans les deux cas, la lecture est facilitée par le regroupement des cellules sur une petite surface.

2 - Etude de la candidacidie.

La méthode cherche à mettre en évidence la destruction intra-leucocytaire des levures après une incubation prolongée. Il est important que toutes les levures soient phagocytées et qu'il ne reste pas de levures extra-cellulaires. On établit, après lyse des polynucléaires, le pourcentage de levures tuées (qui prennent la coloration par le bleu Trypan).

Dans cette technique, la proportion de levures par polynucléaires doit être au départ de 1/1.

a)- Candidacidie des polynucléaires du sang (technique de KERNBAUM-VILDE).

Dans un tube en plastique, on mélange : 0,25 ml de suspension cellulaire à 5.000 polynucléaires/mm³, 0,25 ml de levures vivantes en tampon pH 7,4 à 5.000/mm³, 0,25 ml de sérum normal, 0,25 ml de milieu α . Le tube est mis à incuber en agitateur à 37° pendant 60 mn.

Au bout de 15 mn, on vérifie que plus de 80 % des levures ont été ingérées : la numération est faite en cellule de Malassez après dilution en pipette à globules blancs ; il doit rester moins de 1.000 levures libres par mm³. Après avoir homogénéisé le mélange, à la fin des 60 mn, un échantillon dilué au 1/20ème est déposé entre lame et lamelle pour vérifier que les polynucléaires ont phagocyté et qu'il ne reste plus de levure libre. Dans le tube, les polynucléaires sont lysés par 0,25 ml de déoxycholate de sodium à 2,5 %. On ajoute : 3 ml de bleu de trypan à 0,5 % pour colorer les levures mortes. Le mélange est laissé 10 mn à + 4°. On le centrifuge ensuite 10 mn à 2.000 tours/mn, le surnageant est rejeté ; le culot de centrifugation est resuspendu dans le ml restant. Une goutte de ce culot est montée entre lame et lamelle. Pour faciliter la lecture, la lamelle est lutée. On compte, sur 300 levures, le pourcentage de levures tuées, qui est comparé au pourcentage de levures tuées, normalement infime, existant avant la phagocytose.

b)- Candidacidie des cellules des colonies.

On met en présence 3.000 cellules dans un volume de 20 mm³ de milieu de culture, un volume de 20 mm³ contenant 3.000 levures suspendues dans le tampon phosphate à pH 7,4, 20 mm³ de sérum normal, 20 mm³ de milieu tamponné α . L'ensemble forme une goutte déposée comme précédemment sur le couvercle d'une boîte de Pétri de plastique.

L'incubation dure 60 mn à 37°. On vérifie

que 80 % au moins des levures ont été phagocytées au bout de 15 minutes. Ceci est fait grâce à un prélèvement examiné entre lame et lamelle. On ajoute, à la 60ème minute, pour détruire les cellules et pour colorer les levures tuées, une goutte d'un mélange de déoxycholate à 2,5 % et de bleu Trypan à 0,8 % qu'on laisse en contact 10 mn à 4 °. Une lamelle est ajoutée directement sur le couvercle de la boîte de Pétri et la lecture permet d'apprécier le pourcentage de levures tuées.

R É S U L T A T S .

I - PRESENTATION DES DOSSIERS.

Nos patients se répartissent en quatre groupes : témoins normaux, leucémies myéloïdes chroniques (LMC) et syndrome myéloprolifératif, déficit en G.6.P.D., hypothyroïdie.

a)- Témoins normaux.

Les sujets ayant servi de témoins ont été sélectionnés sur une numération-formule sanguine normale, parmi des malades hospitalisés pour des problèmes médicaux mineurs.

b)- Déficit en glucose-6-phosphate-déshydrogénase.

M. GRA..., 30 ans, présente depuis l'enfance une anémie hémolytique congénitale, avec infections répétées de la sphère ORL. Cette anémie a d'abord été prise pour une maladie de Minkowski-Chauffard et entraîné une splénectomie à l'âge de 10 ans. Le déficit enzymatique est reconnu à l'âge de 18 ans, à l'occasion d'une poussée ictérique.

Le diagnostic du déficit en G.6.P.D. est porté d'après les résultats suivants : globules rouges 2.400.000/mm³ (corps de Jolly sur lame), réticulocytes 8 %, bilirubine totale 64 mg/l, fer sérique 300 γ /l., dosage de la glucose-6-phosphate déshydrogénase 55 unités, puis 0 unité, alors que le taux de 6-phosphogluconate déshydrogénase est normal ; le

taux du glutathion réduit avant incubation à l'acétyl-phényl-hydrazine est de 70,9 mg/100 ml ; après deux heures d'incubation, il est de 14,5 mg/100 ml, la formation de corps de Heinz : 80 %, le test de réduction à la méthémoglobine 98,7 % de méthémoglobine résiduelle, l'autohémolyse à l'étuve : 2 % sans glucose, 4,6 % avec glucose, 2 % avec adénosine, l'hémoglobine alcalino-résistante : 1,2 %, le test de falciformation est négatif. L'électrophorèse de l'hémoglobine est normale. La présente hospitalisation est motivée par un syndrome douloureux abdominal avec tableau d'ictère par rétention.

L'intervention chirurgicale a été rendue nécessaire par les risques locaux. Elle a consisté en une cholécystectomie après une préparation du malade par une exsanguino-transfusion pour faire cesser l'hémolyse et assurer une masse globulaire normale... L'étude de la phagocytose a été faite avant transfusion.

La numération-formule sanguine est alors de : G.R. 2.790.000, Hb 9,1 - G.B. 5.700 - Neutro 56 - Eosino 0 - Baso 2 - Lympho 31 - Mono 11 - Plaquettes 810.000.

La ponction sternale donne : lignée blanche : MB 1 - PM 5 - M 11,5 - MM 14 - PN 44 - ME 1 - MME 0 - PE 2 - B 0,5 - L 18 - Mono 2,5 - PL 0,5 - Lignée rouge : 61,5 rouges pour 100 blancs - PB 2 - EB 45 - EP 38,5 - EA 16,5.

c)- Hypothyroïdie.

Madame FEN... a été hospitalisée dans le Service à 67 ans, pour une anémie normochrome autour de 3.500.000/mm³, rebelle aux différents traitements anti-anémiques habituels. L'année d'après, le diagnostic d'hypothyroïdie est évoqué devant certains signes cliniques : lenteur des réponses, frilosité, constipation, voix rauque, microglossie, sourcils rares. Le diagnostic est alors confirmé par le cholestérol à 2,95 g/l et surtout l'allongement du

réflexogramme achilléen. La malade est alors traitée par 10 cg d'extraits thyroïdiens par jour pendant un mois ; les signes cliniques s'améliorent : la malade quitte le Service.

Le motif de la nouvelle hospitalisation est une chute avec dérobement des membres inférieurs. A cette occasion, un bilan biologique de l'hypothyroïdie est fait.

La numération-formule sanguine est de : G.R. 3.380.000, Rt 0,7 %, G.E. 4.400, PN 78, PE 1, PB 0, L 19, M 4, plaquettes 152.000.

La ponction sternale donne : MGL 2,5, ProM 3,5, MN 17,5, NM 27,5, PN 36, ME 0,5, mE 0,5, PE 1,5, PB 0, L 10,5, Plasmo 0, Mono 0. Lignée rouge: PE 0, EB 1, EP 6, EA 4.

Tests radio-isotopiques : iode sérique total 1,2 μ /100 ml, index résine (T3 test) 0,83, thyroxinémie 2,5 μ /100 ml.

La recherche d'anticorps antinoyaux est positive ; le titre est de 1/10ème, l'aspect homogène.

La malade est mise alors sous thyroxine.

Après amélioration, la patiente part en maison de repos.

d)- Les syndromes myélo-prolifératifs
(Voir Tableau N° I)

= Mr. BEA..., 27 ans, a été hospitalisé pour priapisme ayant entraîné une numération-formule sanguine montrant une hyperleucocytose à 374.000 avec myélémie. A l'examen clinique, il n'y a pas de splénomégalie.

Au moment de l'étude, l'examen hématologique a permis le diagnostic de leucémie myéloïde chronique. N.F.S. : GR 3.400.000 - GB 374.000 -

PA 24 - PE 1 - PB 1 - MMN 29 - MN 39 - MB 2 - Plaquettes 348.000.

Ponction sternale : MB 1 - PM 8 - MN 17 - MMN 29,5 - PN 34 - ME 2 - MME 0,5 - PE 2 - B 3,5 - L 1 - Mono 1,5. Lignée rouge : 3,5 rouges pour 100 blancs.

Le chromosome Phi est présent.

Le malade n'a pas reçu de traitement au moment de l'examen.

= Chez Madame ROU..., 47 ans, on a découvert la LMC à la suite d'épisodes fébriles.

L'hyperleucocytose est à 300.000/mm³ avec myélémie.

L'examen clinique ne montre pas de splénomégalie importante.

Biologiquement, la N.F.S. au moment de l'examen est de : GR 4.000.000 - GB 265.000 - PN 34 - PE 1 - PB 10 - MMN 15 - M 4 - PM 23 - MB 7 - Plaquettes 320.000.

La ponction sternale : lignée blanche : MB 5 - PM 2 - MN 26 - MMN 18 - PN 25 - MME 6 - L 3, peu d'éléments de la lignée rouge, PAL score nul, présence d'un chromosome Phi.

Au moment de l'étude, la malade avait reçu des leucophérèses.

= Madame RAM..., 68 ans, présentait un foyer pulmonaire régressif sous antibiothérapie qui a permis de découvrir une hyperleucocytose à 195.000. Cliniquement, il existe une splénomégalie.

Au moment de l'étude, les résultats hématologiques sont les suivants : N.F.S. : GR 3.560.000 - MB 6 - GB 80.000 - PN 42 - PE 2 - PB 29 - MMN 8 - PN 2 - PM 7 - MB 7 - L 3 - Plaquettes 145.000 - Ponction sternale : MB 7,5 - PM 8,5 - M 25 - MTM 21 - PN 23 - ME 2,5 - PE 0,5 - PB 10 - L 1,5 - Mono 0,5 - Série rouge : 15 rouges pour 100 blancs.

Nombreux mégacaryocytes - Présence d'un chromosome Phi. La patiente n'a pas reçu de traitement au moment de l'étude.

= Madame HER... présentait une atteinte de l'état général ; la découverte d'une hyperleucocytose, d'une splénomégalie, la mise en évidence d'un chromosome Phi ont permis le diagnostic de LMC.

La malade a été traitée par Misulban. Au bout de 4 ans d'évolution, l'apparition d'une fièvre sans foyer apparent a entraîné une nouvelle hospitalisation. La N.F.S. est alors de : GR 2.470.000 - Hb 6,5 - GB 20.100 - PN 27 - PE 3 - PB 14 - MMN 3 - MME 1 - ME 3 - L 4 - Mono 0 - PM 18 - MB 27 - Plaquettes 19.000. La ponction sternale est : MB 12 - PM 7 - M 3 - MMN 4 - PN 17 - ME 1 - B 6 - L 47 - Pl 3. Lignée rouge : 37 rouges pour 100 blancs. Les deux examens montrent le passage à la leucémie aiguë. Au moment de l'examen, la malade est sous corticoïdes.

= Mr. CHA... pose un problème de diagnostic plus complexe. Le début de la maladie est marqué par un épanchement pleural de formule lymphocytaire. En l'absence de diagnostic précis, le malade est mis sous traitement antituberculeux. "La récidive" de l'épanchement, deux ans plus tard, entraîne la découverte d'une hyperleucocytose à 25.700 avec présence de 5 % de métamyélocytes dans le sang périphérique et une éosinophilie à 10 %. Celle-ci va atteindre 78 %.

A ce moment, devant le score des PAL nul, le diagnostic de L.M.C. est porté. Le chromosome Phi n'est pas retrouvé. Le malade est traité par le Misulban. Son chiffre de globules blancs devient alors de 11.500, mais l'éosinophilie persiste à 64 %. Le traitement est arrêté.

Au moment de l'étude, le malade est hospitalisé pour purpura ecchymotique diffus et pétéchial ; il n'a pas de splénomégalie. La N.F.S. montre : GR 3.060.000 - Hb 10 - GB 37.000 - PN 30 - PE 46 - MMN 2 - MME 9 - PM 4 - Mono 3 - L 6 - Pla-

quettes 11.000 (les plaquettes ont des fonctions normales). La ponction sternale : MB 2 - PM 15 - MN 19 - MMN 16 - PN 21 - ME 12,5 - MME 4 - PE 4,5. Lignée rouge : 8 rouges sur 100 blancs. Absence de mégacaryocytes.

Devant la pauvreté des signes en faveur d'une L.M.C., pas de chromosome Phi, discrète splénomégalie, hyperleucocytose modérée (elle n'a jamais été supérieure à 30.000), la myélémie peu importante, se pose un problème diagnostique. On parle de leucémie à éosinophiles. L'évolution aboutit à la mort par hémorragies.

II - ETUDE DE LA PHAGOCYTOSE DANS LE SANG.

a) - Levures tuées (Tableau II).

- Nous avons étudié 5 témoins normaux, afin d'établir l'index phagocytaire, c'est-à-dire le nombre moyen de levures ingérées par polynucléaire. Cet index moyen normal est de $5,2 \pm 1,7$; les extrêmes vont de 3,41 à 7,35. Le pourcentage de polynucléaires capables de phagocyter est en moyenne de 92 ± 10 , avec des extrêmes de 74 à 98. On voit donc que le nombre de levures phagocytées est très important. Il faut tenir compte dans l'interprétation cytologique : puisque les levures déforment le cytoplasme et compriment les noyaux, il est ainsi difficile déjà dans le sang de reconnaître le type de cellules ayant phagocyté.

- Le malade atteint de déficit en G.S.P.D. n'a pu être étudié.

- La malade atteinte d'hypothyroïdie a été étudiée avant, puis sous traitement. Les chiffres sont dans l'ensemble à la limite inférieure de la normale et remontent sensiblement après deux mois de traitement. Une cause d'erreur intervient dans les deux résultats sous traitement qui peuvent modifier l'index de phagocytose : c'est l'administra-

tion de corticoïdes, héli-succinate d'hydrocortisone. En effet, cette patiente, suspecte d'une insuffisance polyendocrinienne, a reçu un traitement substitutif.

- La comparaison statistique de la valeur phagocytaire des polynucléaires du sang circulant a été faite entre les sujets normaux et les malades atteints de syndromes myéloprolifératifs.

Chez les sujets normaux, l'index phagocytaire moyen est de $5,2 \pm 17$ et, chez les malades, de $3,1 \pm 0,9$; le test de Student est inférieur à 0,5 $t = 2,34$, ce qui est statistiquement différent. De même, le pourcentage de polynucléaires capables d'ingestion est de $92 \% \pm 10$ chez les sujets normaux et de $84 \% \pm 10$ chez les malades.

c)- Levures vivantes.

- L'étude de la candidacidie des polynucléaires du sang périphérique a d'abord été faite chez trois sujets normaux (Tableau III). Dans tous les cas, le nombre de levures libres après 15 mn est faible, et le pourcentage de polynucléaires ayant inclus des levures dans leur cytoplasme au bout de 60 mn est très élevé, supérieur à 95 %. Dans ces conditions, on peut apprécier le pourcentage de levures qui ont effectivement été digérées après 60 mn d'incubation : il est supérieur ou égal à 70 %.

- Le malade atteint de déficit en G.6.P.D. montre une phagocytose à la 60ème minute normale : 92 % des polynucléaires contiennent des levures. Il est remarquable de noter que la candidacidie est nettement diminuée : 2 fois moins bonne que chez les sujets normaux.

- La malade atteinte d'hypothyroïdie présente avant traitement une double anomalie :

1°)- Le pourcentage de polynucléaires capables de phagocyter est abaissé à 40 %, ce qui expli-

que qu'il persiste à la 15ème minute plus de 1.000 levures non phagocytées.

2°)- Le pourcentage de levures tuées n'est que de 31 %.

On peut cependant penser que la candidacidie est normale, puisqu'un chiffre faible de polynucléaires seulement ont phagocyté. Après un mois de traitement, le pourcentage de polynucléaires ayant phagocyté monte à 70 %, il reste aux alentours de 1.000 levures libres/mm³ et on peut interpréter plus facilement un déficit de la candidacidie, puisque 39 % seulement des levures sont tuées en 60 mn. Après deux mois de traitement, les chiffres reviennent à la normale, tant en ce qui concerne le pourcentage de polynucléaires ayant phagocyté (90 %) que le pourcentage de levures digérées après phagocytose : 74 %.

- Les trois malades atteints de L.M.C. à la phase chronique ont des anomalies dont l'interprétation n'est pas facile. En effet, les pourcentages de polynucléaires ayant phagocyté au bout de 60 mn sont entachés d'erreurs, car il n'est pas possible à la cellule de Malassez de distinguer le stade des différents éléments constituant la myélémie. On a donc exprimé sur le tableau III, non pas le pourcentage des polynucléaires ayant phagocyté, mais le pourcentage de cellules capables de phagocyter (polynucléaires, métamyélocytes). Dans le cas BEA..., 80 % des cellules ont phagocyté, il reste moins de 1.000 levures à la 15ème minute et la candidacidie est diminuée à 20 %. Dans le cas ROU... et le cas RAM..., le pourcentage de cellules phagocytaires est de l'ordre de 50 %, il y a plus de 2.000 levures libres à la 15ème minute et on ne peut savoir la valeur réelle de la baisse de la candidacidie observée : 3 % et 9 %.

- Les résultats du cas HER..., le nombre de levures libres inférieur à 1.000 et le nombre de levures tuées : 40 % prêtent à la même discussion à cause du fort pourcentage de myéloblastes circulants.

- Dans le syndrome myéloprolifératif de M. CHA..., c'est l'éosinophilie sanguine qui gêne l'interprétation.

Pour lever ces ambiguïtés, il conviendrait de déterminer le pourcentage exact de polynucléaires neutrophiles ayant phagocyté en faisant le contrôle à la 60ème minute, non pas à la cellule de Malassez, mais sur un frottis coloré par le May-Grunwald-Giemsa.

III - VALEUR PHAGOCYTAIRE DES CELLULES EN CULTURES DE MOELLE

a)- Levures tuées (Tableau IV)

On voit sur ce tableau les difficultés rencontrées, principalement dans le recueil d'un nombre suffisant de cellules, pour établir un index phagocytaire.

- La culture de moelle normale a permis, dans trois cas, de chiffrer la phagocytose.

- Le patient ALL... a été étudié par la méthode sur couvercle de boîte de Pétri. On peut chiffrer l'index phagocytaire à 1,1 ; il faut remarquer que les lames comportent un grand nombre de macrophages. Dans notre expérience, le nombre de levures ingérées est considérablement plus faible dans les macrophages que dans les éléments granuleux.

- Les deux témoins LAT... et DUP... ont été étudiés par la méthode dérivée de celle utilisée pour le sang périphérique (méthode en tubes).

Cette méthode, utilisée devant l'échec de la technique précédente, permet une récolte plus importante de cellules et des calculs plus faciles. Les chiffres sont, dans les deux cas, similaires.

On observe ainsi un index à 1,6 et à 1,5 avec les cellules de la lignée granuleuse, et 1,0 et 1,2 avec les macrophages ; 58 % de granuleux ont phagocyté et 49 % de macrophages.

- Chez 6 autres témoins dont l'ingestion des levures a été étudiée en tubes, des difficultés techniques ont empêché de calculer l'index de phagocytose ; en effet, le nombre de polynucléaires qui ont pu être étudiés sur frottis permet de s'assurer de la réalité de la phagocytose, mais ne permet pas d'établir une moyenne de levures ingérées. Il en est de même du cas FEN...

- Dans le cas de M. GRA..., la technique sur couvercle de boîte de Pétri avec un volume de 80 mm³. On note sur lame de nombreuses cellules granuleuses encore immatures. L'index phagocytaire est à 0,9.

- Chez les 5 malades atteints de L.M.C. ou de syndrome myéloprolifératif, on peut affirmer que la phagocytose a lieu par l'inclusion de levures parfois nombreuses.

- Dans un seul cas, le nombre de cellules permet un calcul de l'index. Il s'agit du malade BEA..., où l'index est à 0,4. Il faut signaler qu'un grand nombre de macrophages gêne l'interprétation.

b)- Candidacidie.

= Chez les sujets à moelle normale, la candidacidie des cellules des colonies donne les résultats schématisés sur le tableau V. Le pourcentage de levures tuées par la digestion est en moyenne de 41 ± 20 , avec des extrêmes de 20 à 75 % par rapport aux chiffres obtenus avec le sang (moyenne 70 %). Le test de Student montre une différence significative : $t = 2,53$ %, inférieur à 0,01.

Cette diminution peut être interprétée de plusieurs façons ; la plus vraisemblable est que le pourcentage d'éléments granuleux mûrs est très différent.

Nous donnons, dans le tableau VI, la cytologie moyenne établie dans les colonies au 14ème jour, où il apparaît que les pourcentages sont assez superposables à ceux d'un médullogramme normal. Les différences sont l'absence d'érythroblastes et d'éléments lymphoïdes et la présence de 12% de macrophages.

= Les chiffres obtenus avec les malades GRA..., FEN... (avant traitement) et BEA... sont respectivement de 20 %, 20 % et 27 % ; dans les autres cas, il n'y a pas été trouvé assez de levures pour que les pourcentages soient valables.

T A B L E A U I

NOM	SEXE	SIGNES REVELATEURS	SPLENO- MEGALIE	NUMERA- TION G.B.	ELEMENTS CARACTERISTI- QUES DE LA FORMULE	CHROMOSOME φ	TRAITEMENT AVANT EXAMEN	SUIVI AU MOMENT	DIAGNOSTIC
DEA.	M	Priapisme	+ —	374.000	Myélémie	Présent	0	0	Leucémie myéloï- de chronique
ROU.	F	Episodes fébriles Vertiges	+ —	265.000	Myélémie	Présent	Leucophé- rèses	0	Leucémie myéloï- de chronique
RAM.	F	Foyer pul- monaire, infections	+	195.000	Myélémie	Présent	0	0	Leucémie myéloï- de chronique
HER.	F	Atteinte EG Réhospita- lisation pour fièvre sans foyer apparent	+	20.100	Présence de 27 % de myéloblastes Thrombopénie	Présent	Chimiothé- rapie arrêtée	Corti- coïdes	Leucémie myéloï- de chronique en transformation
CHA.	M	Epanchement pleural Réhospitali- sation pour syndrome hémorragique	+ —	37.000	Myélémie avec éosinophilie thrombopénie	Absent	Chimiothé- rapie Arrêt depuis 8 mois	0	Leucémie myéloï- de chronique Leucémie à éosino- philes

LEGENDE : Données cliniques et hématologiques des cinq patients atteints de leucémie myéloïde chronique ou syndrome myéloprolifératif.

T A B L E A U II

CALCUL DE L'INDEX PHAGOCYTAIRE DES POLYNUCLEAIRES DU SANG PERIPHERIQUE
APRES INCUBATION PENDANT 30 MINUTES AVEC LES LEVURES TUEES

NOMS TEMOINS	INDEX PHAGOCYTAIRE NOMBRE MOYEN DE LEVURES INGEREEES PAR P.N.	MOYENNE + ES —	POURCENTAGE P.N. qui phagocytent	MOYENNE + ES —
LIN...	3,41		74	
FIL...	7,35		98	92
FRA...	4,82	5,2	98	+ 10
HAN...	6,65	+ 1,7	94	—
KOR...	3,84		98	
Malade atteint de déficit en G6.PD				
GRA...	Nombre de cellules insuffisantes.			
Malade atteint d'hypothyroïdie				
FEN...				
1°- Avant traitement	3,40		94	
1° Après un mois d'opo- thérapie	3,51		94	
2°- Après 2 mois d'opo- thérapie	4,20		96	

Malades atteints de syndromes myéloprolifératifs				
BEA...	1,59			70
ROU...	3,36	3,1		85
RAM...	3,72			80
HER...	4,1	+ 0,9		92
CHA...	2,93			95
				84
				+ 10

T A B L E A U III

ETUDE DE LA PHAGOCYTOSE DES LEVURES VIVANTES PAR LES POLYNUCLEAIRES DU SANG PERIPHERIQUE

NOM TEMOINS	LEVURES NON PHAGOCYTEES PAR mm3 APRES 15 MINUTES	POURCENTAGE DE P.N. AVANT PHAGOCYTE A LA 60ème MINUTE	CANDIDACIDIE POURCENTAGE LEVURES TUÉES EN 60 MINUTES
FIL...	1.000	96 %	70 %
FRA...	1.000	96 %	70 %
KOR...	1.000	98 %	75 %
GRA...	1.000	Déficit en GG,PD	
		92 %	35 %
FEN... 1 t		Hypothyroïdie	
Avant trait.	1.200	40 %	31 %
FEN... 2			
Après 1 mois traitement	1.000	70 %	39 %
FEN... 3			
Après 2 mois traitement	1.000	90 %	74 %

MALADES : Syndromes prolifératifs

BEA . . .	1.000	80 %	20 %
ROU . . .	2.000	50 %	9 %
RAM . . .	3.000	60 %	3 %
HER . . .	1.000	40 %	10 %
CHA . . .	1.000	38 %	15 %

T A B L E A U I V

INGESTION DE LEVURES TUEES PAR LES CELLULES ISSUES
DES CULTURES DE CELLULES SOUCHES IN VITRO

NOMS TEMOINS	INDEX PHAGOCYTAIRE	% CELLULES AYANT PHAGOCYTÉ
ALL...	1,1 (surtout macrophages)	30
LAT...	(1,6 granuleux	61
	(1,01 macrophages	41
DUP...	(1,5 granuleux	58
	(1,2 macrophages	49
SZU...	(Phagocytose présente	
FOL...	(Nombre insuffisant pour calculer	
KOW...	(un index phagocytaire	
ASL...	(Phagocytose présente	
GOU...	(Nombre insuffisant pour calculer	
BOS...	(un index phagocytaire	
	<u>Malade atteint de déficit en G6.PD</u>	
GRA...	(0,9 (nombreuses cellules jeunes)	
	<u>Malade atteint d'hypothyroïdie</u>	
FEN...	(Nombre insuffisant de cellules	
	<u>Malades atteints de syndromes myélo-prolifératifs</u>	
BEA...	(0,4 (macrophages surtout)	
ROU...	(Phagocytose présente	
RAM...	(Nombre insuffisant pour calculer	
HER...	(un index phagocytaire	
CHA...	(	

T A B L E A U V

PHAGOCYTOSE DES LEVURES VIVANTES
ET DESTRUCTION DES MICRO-ORGANISMES (CANDIDACIDIE)
PAR LES CELLULES ISSUES DES CULTURES DE CELLULES SOUCHES
IN VITRO

NOM TEMOINS	CANDIDACIDIE POURCENTAGE DE LEVURES TUEES EN 1 HEURE	MOYENNE + ECART STANDARD
ALL...	Nombre insuffisant de levures	41 % + 20 - 20
SZU...	59 %	
FOL...	75 %	
KOW...	20 %	
LAT...	25 %	
DUP...	29,5 %	
ASL...	25 %	
GOU...	45 %	
BOS...	54 %	
	<u>Malade atteint de déficit en G6.PD</u>	
GRA...	20 %	
	<u>Malade atteint d'hypothyroïdie</u>	
FEN... (Av. Tr.)	20 %	
	<u>Malades atteints de leucémie myéloïde chronique</u>	
BEA...	27 %	
ROU...	Nombre insuffisant de levures	
RAM...		
HER...		
CHA...		

T A B L E A U VI

% PEROXYDASÉ (6)		% MGG (14)	% TOTAL (20)
Indiff	0	0,1	0,1
mb1	0,3	0,6	0,5
ProM	1,4	3,5	2,8
MN	16	20,6	19,5
mN	25	25	25
PN	37	25	28,5
ME	2	2,1	2
mE	1	0,9	0,9
PE	0,5	0,9	0,8
Macro	12,5	17	15,6
X	4,3	4,3	4,3
MITOSES	0,9	0,25	0,35

CONTENU CELLULAIRE DES COLONIES

AU 14^{me} JOUR DE CULTURE

Les moyennes sont établies sur 20 examens
et, dans chaque cas, le prélèvement a porté
sur 10 colonies randomisées par boîte.

D I S C U S S I O N

Pour situer le problème de la maturité fonctionnelle des cellules granuleuses immatures, nous avons fait le point sur les connaissances des mécanismes physiologiques entrant en jeu dans la défense de l'organisme contre l'infection. Dans le sang périphérique et les tissus, les phagocytes mûrs sont les polynucléaires (surtout la lignée neutrophile) et les monocytes macrophages attirés sur le lieu de phagocytose par des substances extra-cellulaires. La succession de réactions enzymatiques intra-cellulaires qui aboutissent à la destruction des germes est maintenant connue avec beaucoup de précision, grâce aux multiples déficits observés en clinique à l'occasion d'infections récidivantes. Les connaissances sont beaucoup plus fragmentaires sur la chronologie d'apparition des différentes enzymes de la phagocytose pendant la maturation de la lignée granuleuse.

A l'état normal, la phagocytose comporte plusieurs temps que l'on sépare dans un souci de clarté, mais qui s'imbriquent in vivo. Les polynucléaires sont attirés au niveau du site inflammatoire par des substances chimiotactiques. Celles-ci agissent soit directement : ce sont des cytotoxines, soit par l'intermédiaire du plasma : ce sont des cytotoxigènes (WARD, 1968 - REGAMEY, 1973 - SORKIN, 1970). Les polynucléaires et macrophages sont ainsi accumulés et retenus au niveau du site inflammatoire par un facteur sécrété par les lymphocytes : MIF (migration inhibitory factor) (GOETZL, 1972).

= L'ingestion des bactéries est facilitée par l'adjonction de sérum frais. Celui-ci contient des "opsonines" : substances rendant les bactéries plus aptes à la phagocytose (JOHNSTON, 1969 - QUIE, 1972 - WINKELSTEIN, 1973).

Cette opsonisation peut avoir trois origines :

- 1 - Soit l'action directe d'un anticorps spécifique isolé.
- 2 - Soit celle d'un anticorps spécifique agissant de façon synergique avec le complément par activation du composant C_3 du complément par la voie classique $C_1 - C_4$ et C_2 , - cette voie nécessitant la présence d'un cation divalent : le calcium.
- 3 - Soit enfin par activation de C_3 par la voie alternative : celle-ci est présente chez l'animal non immunisé ; ce mécanisme non spécifique d'opsonisation est appelé "the heat labile opsonin system" ou HLO (WINKELSTEIN et coll., 1972 - JASIN, 1972 - STOSSEL, 1973).

Ces différents mécanismes agissent concurrentiellement in vivo.

La prédominance de l'un ou de l'autre est fonction de l'organisme, de l'importance de l'infection, de la présence ou l'absence d'anticorps spécifique.

Le rôle important des opsonines dans la résistance aux infections a été mis en évidence par un certain nombre de situations cliniques : ALPER, en 1970 (ALPER et coll., 1970), cite le cas d'un malade atteint d'un syndrome de Klinefelter avec une susceptibilité augmentée aux infections ; on ne retrouve pas d'anomalies dans la production d'anticorps, dans l'immunité cellulaire ou les fonctions des leucocytes. Au contraire, il existe un déficit important des fonctions du complément. Ce déficit porte sur C_3 ; il n'y a pas de conversion de C_3 en

C3b. JOHNSTON, en 1973 (JOHNSTON et coll., 1973), rapporte le cas d'un malade présentant une drépanocytose. L'augmentation de la sensibilité aux infections est due à une déficience de la voie alterne d'activation du complément. JOHNSTON pense que cette déficience du système properdine est due à la lyse des drépanocytes.

Les phénomènes observés jusqu'à présent étaient surtout d'origine plasmatique et permettaient la concentration des phagocytes au niveau du site inflammatoire et la préparation des bactéries à l'ingestion.

Les fonctions d'opsonisation que nous venons de voir et de phagocytose proprement dite sont bien différentes. STOSSEL, par sa méthode spectrophotométrique, permet la différenciation de ces deux phases (STOSSEL, 1973). En effet, la spectrophotométrie permet de déterminer la vitesse d'ingestion (liée aux opsonines) et la vitesse de réduction du nitrobleu de tétrazolium (liée à la fonction de la cellule).

= Les polynucléaires et les macrophages vont ensuite englober la bactérie : ils vont émettre des prolongements cytoplasmiques qui vont entourer l'élément à ingérer et fusionner. Il y a ainsi formation d'une vacuole : vacuole de phagocytose (BESSIS, 1972). Les granulations spécifiques (secondaires) ou non (primaires azurophiles) vont fusionner avec la vacuole de digestion et y déverser leur contenu (BAINTON, 1973 - COTRAN, 1969).

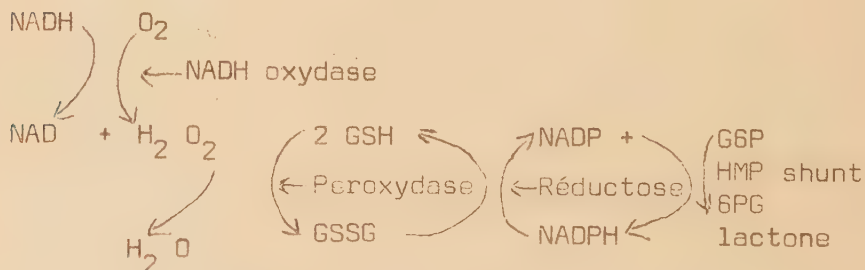
La dégranulation va être séquentielle : au bout de 30 secondes, on peut mettre en évidence, dans les vacuoles de phagocytose, la présence de phosphatases alcalines leucocytaires (P.A.L.) contenues dans les granulations secondaires ou spécifiques. Le pH de la vacuole est neutre, 6,5 à 3 - 4 minutes ; c'est le pH optimum d'action de cette enzyme. Dès la troisième minute, on trouve dans les vacuoles deux enzymes : les P.A.L., provenant

des granulations secondaires, et les myélopéroxydases, provenant des granulations primaires. Le pH de la vacuole varie et atteint pH 4 à la 7e-8e minute. Ce pH est l'optimum pour l'action des myélopéroxydases. Cette digestion est un phénomène actif, consommant donc de l'énergie. Elle provient de la dégradation par la voie de la glycolyse anaérobie du glucose extra-cellulaire et du glucose endogène. L'ingestion entraîne la stimulation de l'activité métabolique du polynucléaire.

Quelques minutes après le début de la phagocytose, la respiration cellulaire augmente. On a une augmentation considérable de la quantité de glucose métabolisé avec production de gaz carbonique et d'eau oxygénée. Il y a une production moindre d'acide lactique et de glycogène (DAVIDSON et coll., 1973 - SBARRA et coll., 1971 - HAKIM et coll., 1973).

L'utilisation du glucose se fait par le shunt des hexoses monophosphate MMP. L'enzyme terminale est une flavoprotéine : la NADH oxydase, qui catalyse la formation d'eau oxygénée.

L'eau oxygénée par décomposition donne lieu à la libération d'un atome d'oxygène, selon le schéma :

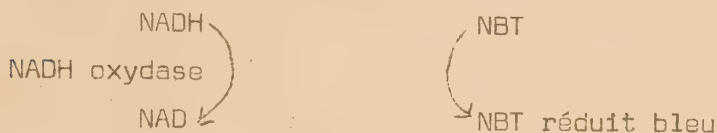


Cet atome d'oxygène va détruire les parois bactériennes (NOSEWORTHY et KARNOVSKY, 1972).

Cette dernière réaction est la base du test au nitrobleu de tétrazolium (NBT) (VILDIF et coll., 1973 - MARION, 1973).

En effet, ce test utilise les propriétés d'indicateur coloré du NBT qui, sous forme oxydée, prend un aspect jaune pâle et, sous forme réduite, une coloration bleue.

Le schéma de cette réaction est :



Les anomalies de la fonction phagocytaire d'origine intra-cellulaire sont dues à un défaut génétique ou à un défaut acquis.

Le type du déficit congénital est la maladie granulomateuse chronique de l'enfant.

BRIDGES et BERENDES, en 1957, ont décrit un syndrome bien défini, appelé granulomatosse fatale de l'enfant. LANDING en a montré l'aspect anatomo-pathologique. En 1966, HOLMES et ses collaborateurs mettent en évidence le déficit phagocytaire original, c'est-à-dire la non destruction par les polynucléaires de certains micro-organismes (NEZELOFF, 1970).

Cette maladie se caractérise par sa transmission sur un mode récessif lié au sexe ; les garçons sont surtout atteints. La clinique est dominée par une succession d'infections précoces dès les premiers mois, toujours avant la troisième année de la vie : infections cutanéomuqueuses : pyodermite, infections de la sphère ORL, rhinite purulente chronique, otite, lésions aphteuses de la cavité buccale ; suppurations ganglionnaires ressemblant aux adénopathies tuberculeuses. L'hépatosplénomégalie existe ; on peut de plus trouver des manifestations broncho-pulmonaires, voire des ostéomyélites chroniques.

Du point de vue biologique, on ne met pas en évidence de diminution des immunoglobulines :

en fait, on retrouve plutôt une augmentation, pas de modifications des tests cutanés ; seul existe un défaut de digestion intra-cellulaire s'exprimant différemment selon les germes : les pneumocoques et les streptocoques sont digérés normalement ; par contre, les staphylocoques et les entérobactéries ne sont pas détruits, ainsi que les candida (MYUNG HI et coll., 1969).

Les polynucléaires montrent des troubles de leur fonction respiratoire marqués par un défaut de consommation d'oxygène et de production d'eau oxygénée. Les myéloperoxydases semblent jouer un rôle, mais on n'a pas pu mettre en évidence un déficit de ces enzymes (VILDE et coll., 1970).

L'utilisation du test au NBT permet le dépistage de cette anomalie et la mise en évidence des mères porteuses de la tare.

HUMBERT (HUMBERT et coll., 1970) a montré que l'activité candidacide et bactéricide des polynucléaires existait dès la naissance. Une perturbation de ces fonctions dans l'enfance signe la maladie granulomateuse chronique de l'enfant.

D'autres atteintes intra-cellulaires peuvent donner un déficit de la fonction phagocytaire : syndrome de CHEDIAK HIGASHI (QUIE, 1973 - STOSSEL et coll., 1972).

A côté de ces anomalies congénitales, il existe des anomalies acquises, notamment au cours des maladies hématologiques.

Pour l'étude des leucocytes de ces malades, on se heurte au problème de la coexistence d'éléments immatures et d'éléments matures.

Les données publiées sur les capacités phagocytaires des cellules immatures sont peu nombreuses.

LICHTMAN, en 1972 (LICHTMAN et coll., 1972),

a montré que la phagocytose est le meilleur critère de maturité des cellules de la lignée granuleuse. Par une étude très minutieuse de l'ensemble des fonctions cellulaires, il observe que le myéloblaste avait une charge de surface fortement négative, ce qui interdit le contact avec les particules chargées positivement comme les bactéries. La membrane du myéloblaste est rigide et peu déformable ; les mouvements sont rares, l'adhésivité de la cellule aux surfaces est médiocre ; l'ingestion particulaire est nulle. A l'opposé, le polynucléaire neutrophile a une charge électrique très faiblement positive, adhère solidement aux surfaces, a une mobilité accentuée et émet des pseudopodes.

Ces propriétés semblent être acquises grâce à une maturation de la membrane dont la déformabilité est très grande. L'ingestion particulaire est particulièrement active. Cette étude a été faite en séparant les populations cellulaires d'un prélèvement médullaire.

C'est aux mêmes conclusions qu'arrivent ALTMAN et ses collaborateurs (ALTMAN et coll., 1974).

Les possibilités de phagocytose ne sont acquises qu'à partir du stade myélocyte et sont maximales pour les éléments les plus mûrs : band-cells et polynucléaires.

La fonction phagocytaire semble n'être complètement développée qu'après passage dans le sang circulant.

L'étude de la fonction phagocytaire peut même servir de test de maturation (GOLDE et coll., 1974).

En pathologie, on sait que les leucoblastes des leucémies aiguës n'ont aucune activité phagocytaire, ce qui explique la grande sensibilité de ces malades aux infections : la neutropénie très sévère n'est pas compensée par la présence de myélo-

blastés même en nombre considérable. Un certain degré de maturation peut cependant s'observer dans les myéloblastes de la leucémie myéloïde chronique. Ceci pourrait traduire un retard de maturation nucléaire, alors que le cytoplasme et la membrane de ces cellules ont déjà acquis une certaine différenciation (WHANG-PENG et coll., 1971).

Les travaux précédents ne font pas appel aux techniques de culture de moelle in vitro, mais comparant les résultats de la phagocytose de populations cellulaires isolées, soit du sang, soit de la moelle, ils permettent de préciser que la maturité de la membrane autorise la phagocytose dès le stade du myélocyte, les possibilités complètes étant caractéristiques des polynucléaires mûrs du sang.

La méthode de culture des cellules souches médullaires in vitro permet un certain nombre de recherches sur la fonction phagocytaire de la lignée granuleuse et on peut suivre les différentes étapes de la maturation, depuis le myéloblaste jusqu'au polynucléaire neutrophile.

Chaque colonie représente la descendance clonale d'une seule souche granuleuse. Nous avons vu qu'au 14ème jour de culture, un équilibre s'établit dans la population de la colonie entre les cellules les plus matures et les cellules les plus jeunes. Il est possible d'étudier les capacités d'ingestion et de destruction du myéloblaste et du promyélocyte, des myélocytes et métamyélocytes, des polynucléaires segmentés ou incomplètement segmentés (band-cells).

Les résultats que nous rapportons permettent d'affirmer que les granuleux issus in vitro des cellules souches médullaires acquièrent une maturité fonctionnelle suffisante pour assurer une ingestion particulière et une destruction intracytoplasmique des levures.

Les granuleux ingèrent en moyenne 1,55 levure par cellule ; les macrophages ont un index

plus faible de 1,1. 30 à 61 % des cellules sont capables d'ingestion.

Or, sur 100 cellules présentes dans les colonies, on a une moyenne de 88 % de cellules théoriquement capables de phagocytose : 19,5 myélocytes N, 25 mMN, 28,5 PN, 21,6 de macrophages.

Dans l'ensemble, ces chiffres sont différents de ceux témoignant de la capacité phagocytaire des polynucléaires neutrophiles du sang périphérique : index moyen 5,2 et pourcentage de cellules ayant phagocyté : 92 %.

L'incorporation particulière n'est que l'un des éléments d'étude de la phagocytose. La candididie reflète certainement mieux la succession des phénomènes enzymatiques intracytoplasmiques qui lui fait suite.

En moyenne, après une heure de séjour intracytoplasmique, 41 % des levures sont tuées par la population cellulaire des colonies. Dans les mêmes conditions, ce pourcentage est de 71 % dans les polynucléaires du sang périphérique. Si l'on tient compte de l'immaturité de la plupart des cellules présentes le 14ème jour dans une colonie, on peut penser que la valeur fonctionnelle des granuleux matures issus in vitro d'une cellule souche ne doit pas être très éloignée de celle des polynucléaires du sang circulant. Une étude plus précise est difficile en raison du petit nombre de cellules par colonie (en moyenne 200).

Peu après les premières descriptions de la méthode de culture de moelle en agar, METCALF a souligné les possibilités phagocytaires des cellules issues in vitro des cellules souches. L'incorporation d'encre de Chine dans le milieu de culture permet d'affirmer l'ingestion particulière : les fragments sont retrouvés dans le cytoplasme des cellules mononucléées ; l'incorporation est cependant faible ou nulle dans les granuleux matures (METCALF et coll., 1967).

Une étude plus complète de la phagocytose a été faite par BARAK (BARAK et coll., 1974). Cet auteur a cultivé en agar 12 moelles de témoins normaux et 4 moelles leucémiques. Toutes les colonies contenues dans 10 boîtes de culture sont recueillies au 20ème jour, ce qui permet d'obtenir environ 50.000 cellules par ml. Ces quantités cellulaires sont suffisantes pour étudier l'ingestion d'une souche de staphylococcus aureus.

Il est possible d'étudier séparément l'index phagocytaire des granuleux et des macrophages. La formule des colonies au 20ème jour comprend en effet : 42 % de polynucléaires neutrophiles matures, 44 % de granuleux immatures, 14 % de macrophages. Chez les sujets normaux, la phagocytose semble aussi active dans les macrophages que dans les granuleux. 61 % des granuleux sont capables d'ingérer des staphylocoques, 42 % des granuleux réduisent de plus le NBT. Pour les macrophages, ces chiffres sont respectivement de 70 % et de 53 %. Ce fait est sujet à controverses : il est plus habituel de dire que les monocytes ont une ingestion plus faible que les polynucléaires, bien que la bactéricidie soit de même valeur (STEIGBIGEL et coll., 1974).

= Pour les résultats obtenus dans notre courte série pathologique, nous devons être prudente dans nos conclusions, du fait du petit nombre de cellules recueillies.

= Le cas PEN... est assez particulier pendant la phase préthérapeutique, puis le début du traitement de cette hypothyroïdie sévère ; la phagocytose s'est montrée déficiente dans le sang. Le nombre de cellules ayant phagocyté est normal : 94 %, mais le nombre moyen de levures est inférieur à la normale index (ici 3,45), avec une candidacidie pathologique 31 %.

De même, la candidacidie n'est que de 20 %

dans les granuleux issus de sa culture de moelle.

Après 2 mois de traitement substitutif, le sang se normalise : 96 % de cellules phagocytaires index 4,2, candidacidie 74 %. La moelle n'a malheureusement pu être réétudiée. A notre connaissance, de tels faits n'ont pas été signalés dans les maladies endocriniennes.

= Le cas du patient atteint de déficit en G6. PD montre également des résultats pathologiques.

Dans le sang, la candidacidie est basse : 38 % ; dans la moelle, elle est de 20 % avec un index phagocytaire à 0,9. Ces faits sont connus ; on rapporte le déficit de la phagocytose à un trouble de l'utilisation énergétique du glucose lié à la carence en G6.PD (QUIE, 1973).

Dans nos 5 cas de syndromes pyéloprolifératifs, le pourcentage des cellules phagocytaires est en moyenne de 84 %, ce qui tient probablement à la myélémie ; l'index phagocytaire est de 3,1, la candidacidie très basse, inférieure à 15 %.

Ces résultats du sang sont corroborés par ceux trouvés avec les cellules cultivées in vitro ; dans ce cas, on trouve un index phagocytaire à 0,4 et une candidacidie à 27 %. La difficulté à obtenir un grand nombre de cellules sur lame doit rendre prudent dans l'interprétation. Si ces résultats se confirment, ces faits tendraient à montrer que, dans la leucémie myéloïde chronique, on peut trouver une anomalie de la phagocytose.

Les déficits acquis de la phagocytose ont été trouvés ou non dans certaines atteintes hémato-logiques.

GOLDMAN (GOLDMAN et coll., 1973) met en évidence, pour des LAM, une activité phagocytaire normale, avec activité phagocytante diminuée, et pense que cette altération de la candidacidie serait due

à un facteur plasmatique, plutôt qu'à une atteinte cellulaire. Par contre, dans les leucémies myéloïdes chroniques, il ne trouve pas d'altération ni pour la phagocytose ni pour la candidacidie.

CONSTANTOPOULOS (CONSTANTOPOULOS et coll., 1973) montre que, dans les LAM, la phagocytose est normale ou diminuée ; par contre, dans les myélofibroses, la phagocytose est normale. La leucémie myélomonocytaire présente une phagocytose supérieure à la normale.

CLINE (1973), lui, met en évidence, chez des malades atteints de leucémies myélomonocytaires, une phagocytose normale, mais pas d'inhibition de la multiplication intra-cellulaire des micro-organismes ; de ce fait, les bactéries intra-cellulaires sont protégées de l'atteinte des antibiotiques.

LERHER et CLINE (1971) montrent une atteinte de l'activité de candidacidie des neutrophiles du malade atteint d'Hodgkin et de L.A., alors que la fonction phagocytaire est conservée.

DAVIS (DAVIS et coll., 1971) montre, chez un malade atteint d'une leucémie à myélomonocytes, un déficit en myéloperoxydase et, de ce fait, une anomalie de l'activité bactéricide des cellules avec conservation de la phagocytose.

SOUILLET et coll. (1973) mettent en évidence, chez des malades atteints de leucémie aiguë lymphoblastique en rémission, un déficit dans l'activité de phagocytose et de bactéricidie au cours d'une complication. Ils pensent que ce serait dû à des facteurs sériques inconnus, présents dans le sérum.

WHANG-PENG J. et coll. (1971) ont étudié les cellules de leucémie myéloïde chronique en transformation ; ils ont montré que les cellules ont une capacité diminuée de maturation, mais que, par contre, la propriété de phagocytose est intacte. Ils pensent donc que la membrane et le cyto-

plasme ont une fonction intacte, et que seul le noyau est atteint.

ZITTOUN et BERCHE (1973) ont trouvé une diminution de la phagocytose dans les syndromes myéloprolifératifs, et ont mis en évidence l'existence de deux clones : 1 clone à fonction phagocytaire normale et un clone avec atteinte de la fonction phagocytaire.

Pour BARAK, l'étude des cultures de moelle de ses 4 patients leucémiques (2 leucémies aiguës myéloblastiques, une leucémie aiguë monoblastique, une leucémie aiguë myélomonoblastique) montre que les granuleux ont une phagocytose et une réduction du NBT modérément diminuées ou normales, et que les macrophages ont une fonction phagocytaire normale.

Cependant, il n'a pas pratiqué d'étude de la bactéricidie du germe utilisé (BARAK et coll., 1974).

GOLDE (GOLDE et coll., 1974), qui étudie pour des malades atteints de LMC la maturation des cellules provenant de cultures médullaires ou de cultures du sang, trouve une phagocytose normale. Les conditions d'étude sont différentes : cellules prélevées au 20ème jour. Il ne donne pas les résultats chiffrés de son étude sur la phagocytose.

En définitive, il nous paraît nécessaire, dans l'état actuel des recherches, d'être prudente sur l'existence ou non d'une atteinte des cellules issues in vitro de cultures médullaires dans les leucémies myéloïdes chroniques.

CONCLUSION

Les macrophages et les granuleux obtenus in vitro par culture des cellules- souches médullaires peuvent être étudiés du point de vue de leur maturation par des techniques de phagocytose. Le nombre des cellules contenues dans chaque colonie est faible et doit conduire à adopter des microméthodes.

La fonction phagocytaire est mise en évidence, dans ces deux catégories de cellules. Comparés aux résultats obtenus avec les polynucléaires du sang périphérique, les résultats normaux montrent :

A)- Une ingestion des levures tuées ou des levures vivantes à partir du stade myélocyte.

- Les polynucléaires neutrophiles ingèrent un nombre de levures parfois aussi important que les cellules du sang. Les polynucléaires éosinophiles ont une ingestion négligeable.

- Les macrophages ont une ingestion plus faible que les granuleux.

B)- L'index phagocytaire (nombre de levures ingérées par cellule) est de 5,2 dans le sang et de 1,55 dans les cultures, ce qui peut s'expliquer par un nombre élevé de cellules immatures dans les colonies.

C)- La candidacidie (pourcentage de levures intracytoplasmiques tuées après 60 minutes) est de 72 % dans les polynucléaires du sang et de

41 % dans les cellules des cultures.

Les résultats pathologiques doivent être interprétés avec prudence, en raison du petit nombre de malades et de certaines difficultés techniques. Nous avons observé :

A)- Une ingestion normale ; mais une candidacidie faible chez une malade atteinte d'hypothyroïdie sévère. Ces anomalies se sont amendées après 2 mois d'opothérapie.

B)- Un déficit sévère de la candidacidie, chez un patient atteint de déficit en glucose-six-phosphate-déshydrogénase.

C)- Un déficit de la candidacidie, chez un malade atteint de leucémie myéloïde chronique.

La signification de ces faits reste discutée.

VU & PERMIS D' IMPRIMER :

Le Recteur
de l'Académie de Paris,

R. MALLET

Le Doyen de la Faculté de Médecine
Lariboisière - Saint-Louis,

E. FOURNIER

Le Président de la thèse,

J. BOUSSER

R É S U M É

La phagocytose a surtout été étudiée pour les éléments du sang périphérique. L'application de microméthodes nous a permis la mise en évidence de cette fonction pour les cellules provenant de cultures médullaires.

I - MATERIEL ET METHODES

- La culture des cellules d'origine médullaire est faite en gel de méthyl-cellulose en présence de facteur stimulant; Les cellules issues de C.F.U. - C. (Colony Forming Cells in Culture) sont étudiées au 14ème jour d'incubation.

- Les colonies sont prélevées sous contrôle de la vue au microscope inversé. Pour l'étude de la candidacidie, on met en présence le même nombre de levures et de cellules. Après incubation, l'adjonction de bleu Trypan permet la différenciation des levures tuées et des levures vivantes.

- Le calcul de l'index phagocytaire nécessite un nombre de levures cent fois plus élevé que celui des cellules. Les cellules sont recueillies par cytocentrifugation. La lecture se fait au microscope après coloration au May-Grünwald-Giemsa.

Nous avons procédé à l'étude de la phagocytose par les cellules issues des cultures médullaires provenant de différents malades : une malade atteinte d'hypothyroïdie, un malade souffrant

de déficit en glucose six-phosphate-déshydrogénase, cinq malades atteints de leucémie myéloïde chronique .

II - RESULTATS

Nous avons mis en évidence :

- Chez notre malade atteinte d'hypothyroïdie, un déficit de la candidacidie, non retrouvé après traitement.
- Chez le patient atteint de déficit en glucose six-phosphate-déshydrogénase, une diminution importante de la candidacidie.
- Chez un de nos malades, atteint de leucémie myéloïde chronique, l'existence d'une candidacidie diminuée.

Devant le petit nombre de malades étudiés et devant certains problèmes techniques, nous ne pouvons qu'interpréter les résultats avec prudence.

III - UNE REVUE DE LA LITTÉRATURE

concernant notamment les différents temps de la phagocytose permet de situer les problèmes posés.

B I B L I O G R A P H I E

- 1- ALPER C.A., ABRAMSON N., JOHNSTON R.B. Jr.,
JANDL J.M., ROSEN F.S. - Increased susceptibility to infection associated with abnormalities of complement - mediated function and the third component of complement (C₃). -
N.-Eng. J. Med. 1970, 282, 7, 349, 353.
- 2- ALTMAN A.J., ARNOLD J., STOSSEL T.P.- Functional Immaturity of bone marrow bands and polymorphonuclear leukocytes.-
Brit. J. Haematol. 1974, 27, 241, 245.
- 3- BAINTON D.F.- Sequential degranulation of the two types of polymorphonuclear leukocyte granules during phagocytosis of microorganisms.
J. Cell. Biol. 1973, 58, 2, 249, 264.
- 4- BÄNNATYNE R.M., SKOWRON P.N., WEBER J.L.- Jobs' syndrome. A variant of granulomatous disease. Report of a case.
J. Pediatr. 1969, 75, 2, 236, 242.
- 5- BARAK Y., SHORE N.A., MIGGINS G.R., VADAKAN V.V.- Functional cellular maturation in cultures of human haematopoietic cells.-
Brit. J. Haematol. 1974, 27, 543, 549.
- 6- BESSIS M.- Cellules du sang normal et pathologique.- Editions Masson, 1972, 429.

- 7- BRADLEY T.R., METCALF D.- The growth of mouse bone marrow cells in vitro.
Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 1966, 44, 287, 300.
- 8- BRADLEY T.R., SUMMER M.A. - Stimulation of mouse bone marrow colony growth in vitro by conditioned medium.
Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 1968, 46, 607, 618.
- 9- CONSTANTOPOULOS A., LIKHTE V., CROSBY W.H., NAJJAR V.A.- Phagocytic activity of the leukemic cell and its response to the phagocytosis stimulating tetrapeptide tufts.-
Cancer. Res. 1973, 33, 6, 1230, 1234.
- 10- CHERVENICK P.A., BOGGS D.R.- Bone marrow colonies : stimulation in vitro by supernatant from incubated human blood cells.
Science 1970, 169, 691, 692.
- 11- CLINE M.J.- Defective mononuclear phagocyte function in patients with myelomonocytic leukemia and in some patients with lymphoma.
J. Clin. Invest. 1973, 52, 2185, 2190.
- 12- COTRAN R.S., LITT M.- The entry of granule, associated peroxidase into the phagocytic vacuoles of eosinophils.
J. Exp. Med. 1969, 129, 6, 1291, 1299.
- 13- DAO C., BILSKI-PASQUIER G., BOUSSER J.- Age sex and stem cells number in normal human bone marrow.
Blood (submitted).
- 14- DAO C., ZITTOUN R., BILSKI-PASQUIER G., BOUSSER J.- La culture de moelle osseuse chez l'homme, numération des cellules sou-

ches chez 100 sujets normaux.
Path. Biol. 1975 (to be published).

- 15- DAO C., ZITTOUN R., FONTRouGE M., BOUSSER J.-
Culture de granuleux et macrophages in vitro.
Possibilités d'étude de la fonction phagocy-
taire des éléments issus des cultures souches.
Communication Bordeaux, Soc. F. Path. infec-
tieuse, Juin 1974 - En préparation.
- 16- DAO C., ZITTOUN R., CADIDOU M., BOUSSER J.,
BILSKI-PASQUIER G.- A cytocentrifuge micro-
technique in collecting cells grown in methyl-
cellulose (common and uncommon cells in the
colonies arising from human CFU-C).
Communication Manchester, EORTC Stem Cell
Club, March 1974.
- 17- DAVIDSON W.D., TANAKA K.R.- Instantaneous and
continuous measurement of phagocytis.
Stimulated glucose oxidation in human granu-
locytes by an ionization chamber method.-
Brit. J. Haematol. 1973, 25, 6, 783, 792.
- 18- DAVIS A.T., BRUNNING R.D., QUIE P.G.- Polymor-
phonuclear leukocytes myeloperoxidase defi-
ciency in a patient with myelomarcocytic
leukemia.
New-Eng. J. Med. 1971, 285, 789, 790.
- 19- GOETZL E.J., AUSTEN K.F.- A neutrophil immobi-
lizing factor derived from human leukocytes.
I- Generation and partial characterization.-
J. Exper. Med. 1972, 136, 6, 1564, 1580.
- 20- GOLDE D.W., BYERS L.A., CLINE M.J.- Chronic
myelogenous leukemia cell growth and matura-
tion in liquid culture.
Cancer Res. 1974, 34, 2, 419, 423.
- 21- GOLDMAN J.M., TH'NG K.H.- Phagocytic function

of leukocytes from patients with acute myeloid
an chronic granulocytic leukemia.-
Brit. J. of Haematol. 1973, 25, 3, 299, 308.

- 22- HAKIM J., BOIVIN P., BOUCHEROT J., TROUBE H.-
Etude de quelques activités enzymatiques
granulocytaires chez l'adulte sain.-
Nouv. Rev. Fr. Hématol. 1973, 13, 2, 153, 162.
- 23- HUMBERT J.R., KURTZ M.L., HATHAWAY W.E.- Increased
reduction of nitroblue tetrazolium by
neutrophils of newborn infants.
Pediatrics 1970, 45, 1, 125, 128.
- 24- ICHIKAWA Y., PLUZNICK D.M., SACHS L.- In vitro
control of the development of macrophage and
granulocyte colonies.
Proc. Nat. Acad. Sci. 1966, 56, 488, 495.
- 25- JASIN H.E.- Human heat labile opsonins : evi-
dence for their mediation via the alternate
pathway of complement activation.
J. Immunol. 1972, 109, 26, 31.
- 26- JOHNSTON R.B. Jr., KLEMPERER M.R., ALPER C.A.,
ROSEN F.S.- The enhancement of bacterial pha-
gocytosis by serum the role of complement
components and two cofactors.
J. Exp. Med. 1969, 129, 1275, 1290.
- 27- JOHNSTON R.B. Jr., NEWMAN S.L., STRUTH A.G.-
An abnormality of the alternate pathway of
complement activation in sickle cell disease.
New-Engl. J. Med. 1973, 288, 16, 803, 808.
- 28- KERNBAUM S., VILDE J.L.- Etude du pouvoir can-
didacide des polynucléaires neutrophiles
humains.
Path. Biol. 1974, 22, 1, 61, 66.

- 29- LEHRER R.I., CLINE M.J.- Leukocyte candidacidal activity and resistance to systemic candidiasis in patients with cancer.
Cancer USA (1971), 27, 5, 1211, 1217.
- 30- LICHTMAN M.A., WEED R.I.- Alteration of the cell periphery during granulocyte maturation : relationship to cell function.-
Blood 1972, 39, 301, 316.
- 31- MARION R.- The nitroblue tetrazolium test.
Can. J. Med. 1973, 30, 31.
- 32- METCALF D.- Transformation of granulocytes to macrophages in bone marrow colonies in vitro.-
J. Cell. Physiol. 1971, 77, 277, 280.
- 33- METCALF D., BRADLEY T.R., ROBINSON W.- Analysis of colonies developing in vitro from mouse bone marrow cells stimulated by kidney feeder layers or leukemic serum.
J. Cell. Physiol. 1967, 69, 93, 108.
- 34- METCHNIKOFF E.- Leçons sur la pathologie comparée de l'inflammation.
Paris, Masson et Cie, éd., 1892.
- 35- MYUNG-HI KIMOH, RODEY G.E., GOOD R.A., CHILGREN R.A., QUIE P.G.- Defective candidacidal capacity of polymorphonuclear leukocytes in chronic granulomatous disease of childhood.
J. Pediatr. 1969, 75, 2, 300, 303.
- 36- NEZELOF C.- La maladie granulomateuse chronique.
Rev. Europ. Et. Clin. Biol. 1970, 15, 9, 938, 941.
- 37- NOSEWORTHY J., KARNOVSKY M.L.- Role of peroxide in the stimulation of the hexose monophosphate shunt during phagocytosis by polymorphonuclear

leukocytes.

Enzyme 1972, 13, 110, 131.

- 38- PIKE B.L., ROBINSON W.P.- Human bone marrow colony growth in agar gel.
J. Cell. Physiol. 1970, 76, 77, 84.
- 39- PLUZNICK D.H., SACHS L.- The cloning of normal "mast" cells in tissue culture.
J. Cell. and Comp. Physiol. 1965, 66, 319, 324.
- 40- QUIE P.G.- Bactericidal function of human polymorphonuclear leukocytes.
Pediatrics 1972, 50, 2, 264, 270.
- 41- QUIE P.G.- Infections due to neutrophil malfunction.
Médecine 1973, 52, 5, 411, 417.
- 42- RECAMÉY A.- Chimiotactisme des polynucléaires humains "in vitro". Etude de la méthode chez adulte normal.
Ann. Immunol. 1973, 124, 4, 493, 509.
- 43- SBARRA A.J., KARNOVSKY M.L.- The biochemical basis of phagocytosis. Metabolic changes during the ingestion of particles by polymorphonuclear leukocytes.
J. Biol. Chem. 1971, 234, 6, 1355, 1362.
- 44- SENN J.S., Mc CULLOUGH E.A., TILL J.E.- Comparison of colony forming ability of normal and leukemic human marrow in cell culture.
Lancet 1967, 2, 597, 598.
- 45- SORKIN E.- Chimiotactisme des phagocytes.
Méd. Hyg., 1970, 28, 226, 229.
- 46- SOUILLET G., GERMAIN D., CARRAZ M., VEYSSEYRE

- C., FROBERT Y.- Etude de l'activité phagocytaire et bactéricide des polynucléaires de malades atteints de leucémie aiguë lymphoblastique en rémission.
Rev. Inst. Pasteur Lyon 1973, 6, 2, 87, 121.
- 47- STEIGBIGEL R.T., LAMBERT L.H.Jr., REMINGTON J. S.- Phagocytic and bactericidal properties of normal human monocytes.
J. Clin. Invest. 1974, 53, 1, 131, 142.
- 48- STOSSEL T.P.- Evaluation of opsonic and leukocyte function with a spectrophotometric test, in patients with infection and with phagocytic disorders.
Blood 1973, 42, 1, 121, 130.
- 49- STOSSEL T.P.- Phagocytosis (I, II, III).
New-Engl. J. Med. 1974, 290, 717, 723, 774, 780.
- 50- STOSSEL T.P., ROOT R.K., VAUGHAM M.- Phagocytosis in chronic granulomatous disease and the Chediak Hashishi syndrome.-
New-Engl. J. Med. USA 1972, 286, 3, 120, 123.
- 51- VILDE F., NEZELOF C.- Etude de la réduction du nitrobleu de tetrazolium après phagocytose de particules de latex par les leucocytes humains "in vitro". A propos de 200 examens.
Path. Biol. 1973, 21, 6, 629, 637.
- 52- VILDE F., VILDE J.L., BASSET F., NEZELOF C.- La maladie granulomateuse chronique. Etude de la phagocytose des polynucléaires (A propos de 4 observations).-
Rev. Europ. et Clin. Biol. Fr. 1970, 15, 9, 948, 958.
- 53- WARD P.A.- Chemotaxis of mononuclear cells.-
J. Exp. Med. 1968, 128, 1201, 1219.

- 54- WHANG-PENG J., PERRY S., KNUTSEN T.A., GART J.J.- Cell cycle characteristics, maturation and phagocytosis in vitro of blasts cells from patients with chronic myelocytic leukemia. Blood 1971, 38, 153, 161.
- 55- WINKELSTEIN J.A.- Opsonins : their function identity and clinical significance. J. Podiatr. 1973, 82, 5, 747, 753.
- 56- WINKELSTEIN J.A., SHIN H.S., WOOD W.B. Jr.- Heat labile opsonins to pneumococcus III. The participation of immunoglobulin and of C₃ activation. J. Immunol. 1972, 108, 1681, 1689.
- 57- WORTON R.G., Mc CULLOGH E.A., TILL J.E.- Physical separation of haemopoietic stem cells from cells forming colonies in culture. J. Cell. Physiol. 1969, 74, 171, 182.
- 58- ZITTOUN R., BERCHE P.A.- L'adhésivité au verre et le pouvoir phagocytaire des polynucléaires neutrophiles dans les syndromes myéloprolifératifs et les anémies réfractaires.- Path. Biol. 1973, 21, 3, 271, 277.
-

